

# Clostridia のマイトマイシン (MC) と 紫外線 (UV) 感受性

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

水 野 治 郎

先に当教室の Kiritani<sup>1)</sup>は *Clostridium botulinum* A, B, C, D, E, F 型で, Shimamura<sup>2)</sup>は *C. sordellii* で, 竹松<sup>3)</sup>は *C. haemolyticum* を用いて, マイトマイシン C (以下 MC と記す) あるいは紫外線 (UV) に対する感受性を検討した所, そのほとんど全ての菌株が両者に感受性を示し, 且つその溶菌液中に phage-like particles, 並びに lytic agent (s) が存在すると報告した。MC あるいは UV 感受性は該菌の lysogeny (溶原性) と関係があり, 且つまた lysogeny は toxigenicity (毒素原性) ととも深い関係のあることが他の菌種で知られていること<sup>4)~6)</sup>を考え, 著者は更に他の数多くの病原性 clostridia を用いて lysogeny がどの程度各菌種間に存在するかについて調べるため本研究を志した。*C. botulinum* C 型菌の lysogeny と toxigenicity との間に実験的には密接な関係があることは, すでに Inoue<sup>4)</sup> Oguma<sup>5)</sup>, Eklund<sup>6)</sup>が報告している。そこで, 著者の教室では最近 *C. botulinum* C 型の有毒, 無毒株を多数土壌から分離しているので, 自然界に多数存在するこの野生株の間にも果して MC 感受性と毒素原性との間に密接な関係があるかどうか, 検討を試みた。また, 当教室の Shimamura<sup>2)</sup>が *C. sordellii* の全ての被験株が MC 感受性であったと述べているが, 今回は更に *C. sordellii* の無毒で且つウレアーゼ陰性の株が多数得られたので (Nakamura<sup>7)</sup>), これについても併せて検討することにした。また, 非病原性 clostridia について数多くの菌種, 菌株を用いて MC に対する感受性を検討した。

## 材 料 と 方 法

### I. 使用菌株

実験に供した菌株の菌種名, 菌株数, 並びにそれら

の由来を表 1 に示した。この中で *C. botulinum* C 型無毒株 (8 株) としたのは, 芹川<sup>8)</sup>が潟周辺の土壌から分離した時<sup>8)</sup>, 同時に分離同定されたものの分与を受けたものである (芹川<sup>8)</sup>は培養性状, 生化学的性状が合致する点, および *C. botulinum* C, (D) 型にのみ特異的に反応する *C. botulinum* C 型凝集抗血清を用いて同定している)。*C. bifermentans* 30 株は正常型と異型との 2 型に分けた。即ち 24 株は成書記載通りの典型的な性状を示したのでこれを正常型としたが, KZ 507, KZ 508, KZ 509, KZ 510, KZ 511, KZ 512 の 6 株は Zeissler 平板上のコロニー性状が pinpoint コロニーを呈するのみならず正常型の溶血環よりはるかに大きな溶血環を呈したこと, また Nakamura<sup>9)</sup>が細胞壁糖構成の上でも一般の *C. bifermentans* 型 (グルコース, ラムノース, マンノースすべて陽性) と異なると述べていることを考慮して異型 *C. bifermentans* (グルコース, マンノース陽性ただしラムノース陰性) として扱うこととした。(ただしこれらの株は生化学的性状, および DNA-DNA homology 上 *C. bifermentans* に一致した<sup>9)</sup>)。*C. perfringens* の  $\alpha$ -毒素原性の強弱の差のある株を得るために Yamagishi<sup>10)</sup>の方法に従って土壌を 100℃ 1 時間あるいはそれ以上加熱して分離したものと, 非加熱あるいは 70℃ 10 分加熱して分離した一群の菌を使用した。Yamagishi<sup>10)</sup>の報告では前者のグループの中にはマウスを殺す毒素原性のものはなく, 後者のもののほとんどはマウスを殺すに十分な  $\alpha$ -毒素原性を持つとされている。さらに C 型と D 型菌に対してはそれぞれ  $\theta$ -,  $\beta$ -, 並びに  $\epsilon$ -毒素原性を Oakley<sup>11)</sup>の方法に従って検討した。毒素の産生は吉沢<sup>12)</sup>の記載に従った。*C. tetani* の有毒, 無毒株としては教室保存株 30 株を用い, 毒素原性の検索は真田<sup>13)</sup>の記載に従った。*C. tetani*

Susceptibilities of clostridia to mitomycin C (MC) or ultra-violet (UV) ray.  
Jiro Mizuno, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

表1 使用菌株の菌種と由来

STRAIN		SOURCE
<i>C. chauvoei</i>	尚州, 497, 中和, 熊本肝1, 岩手心1, 黄州, 岩手, 福田, 満浦, 359, 宗谷腸骨, 熊本4, 山梨4, 沖繩, 義城. kz 383, kz 385, kz 386, kz 387. kz 380, kz 382. kz 997.	NIAH SVSL KU NIHJ
<i>C. septicum</i>	kz 993, kz 994, kz 995, kz 996, kz 1000, kz 1001, kz 1003, kz 1004, kz 1005. kz 1006, kz 1007, kz 1008, kz 1009, kz 1010, kz 1011. kz 381. 福生.	NIHJ KU GU NIAH
<i>C. botulinum</i>	type C 85-8, 85-12, (85-14), (85-18), 85-19, 85-20, 86-3, (86-19), 87-18, 88-14, 88-16, 91-46, (92-13), 93-6, 95-2, 96-1, (98-1), (98-2), 98-4. (CB-3), (CB-13)* STOCKHOLM.	KU TMRL HIPH
<i>C. sordellii</i>	urease -positive : kz 1383, kz 1384, kz 1385, kz 1386, kz 1387, kz 1388, kz 1389, kz 1390, kz 1391, kz 1392. -negative : kz 1355, kz 1356, kz 1357, kz 1358, kz 1359, kz 1362, kz 1364, kz 1365.	GU
<i>C. bifermentans</i>	kz 501, kz 503, kz 504, kz 505, kz 519, kz 520, kz 521, kz 522, kz 524, kz 525, kz 530, kz 507, kz 508, kz 509, kz 510, kz 511, kz 512. 203, 205, 206, 216, 218, 220, 614, 618, 619. kz 1344, kz 1345, kz 1346. 506.	KU GU HU
<i>C. histolyticum</i>	948, 3313 R, 3254. kz 620, kz 622. 12 R.	NCTC KU VPI
<i>C. perfringens</i>	type A strains isolated from soil samples unheated kz 215, kz 216, kz 217, kz 218, kz 219, kz 220, kz 221, kz 222, kz 223, kz 224, kz 932, kz 934, kz 937, kz 938, kz 940. Y-1, Y-2, Y-5, Y-6, Y-7, Y-8, Y-13, Y-14, Y-15, Y-16. heated at 70 C for 10 min kz 924, kz 943, kz 944, kz 945, kz 946, kz 947, kz 948, kz 949, kz 950, kz 951. heated at 100 C for 1 hr or more kz 225, kz 226, kz 227, kz 228, kz 229, kz 230, kz 231, kz 232, kz 233, kz 234, kz 955, kz 956, kz 959, kz 965, kz 967, kz 968, kz 970, kz 973, kz 976, kz 978, kz 986. type C kz 111, kz 112, (kz 113), kz 114, kz 115, (kz 116), (kz 117), kz 119, (kz 120). (AA220), (CWC45). (kz 302). type D kz 305, (kz 442), kz 443, kz 444, kz 445, kz 446, kz 447, kz 448, kz 450, kz 451.	KU VPI SVSL KU KU
<i>C. tetani</i>	kz 1115, kz 1122, kz 1126, kz 1142, kz 1143, kz 1151, kz 1154, kz 1156, kz 1158, kz 1160, kz 1173, kz 1174, kz 1177, kz 1179, kz 1180, kz 1200. PO8, M-3, M-4, M-7, M-9, M-10, M-11, M-16, M-17, (M-2), (M-6), (M-14), (M-20). CN655.	KU PAST
<i>C. tetanomorphum</i>	CIA, 1772 C, A. 2909.	PAST NCTC

\* ( ): 無毒株以下これに準ず

……………全て無毒株

<i>C. cochlearium</i>	TRO2M, MONTREAN, CREGNEN, 1569. 17787. 6797.	PAST ATCC NCIB
<i>C. butyricum</i>	kz 595, kz 596. kz 589, kz 591.	KU IFO
<i>C. multifementans</i>	kz 635, kz 636, kz 637. 17795.	KU ATCC
<i>C. acetobutyricum</i>	kz 586, kz 587, kz 588.	IFO
<i>C. absonum</i>	kz 1214, kz 1215, kz 1216, kz 1220, kz 1225.	KU
<i>C. paraperfringens</i>	kz 354, kz 355, kz 356, kz 359, kz 360, kz 362, kz 365.	KU
<i>C. tertium</i>	kz 1105, kz 1106, kz 1107, kz 1108, kz 1109.	KU
<i>C. difficile</i>	17857, 17859.	ATCC
<i>C. capitovale</i>	9687, 17856.	ATCC
<i>C. sphenoides</i>	3500, 3560.	ATCC
<i>C. carnis</i>	5530.	VPI
<i>C. innocuum</i>	14501.	ATCC
<i>C. paraputrificum</i>	17864.	ATCC
<i>C. lentoputrescens</i>	17794.	ATCC

ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, U. S. A.

GU : Gifu Univ, Gifu, Japan.

HIPH : Hokkaido Institute for Public Health, Sapporo, Japan.

HU : Hong Kong Univ, Hong Kong.

IFO : Institute for Fermentation, Osaka, Japan.

KU : Kanazawa Univ, Kanazawa, Japan.

NCIB : National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Scotland.

NCTC : National Collection of Type Cultures, London, England.

NIAH : National Institute for Animal Hyg, Tokyo, Japan.

NIHJ : National Institute of Health, Tokyo, Japan.

PAST : Pasteur Institute, Paris, France.

SVSL : State Veterinary Serum Laboratory, Copenhagen, Denmark.

TMRL : Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, Japan.

VPI : Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, U. S. A.

無毒株 4 株は形態, 培養性状, 生化学的性状および DNA-DNA homology 上 *C. tetani* に 80% 以上一致したものである (Nakamura unpublished).

## II. 使用培地

使用培地の組成を表 2 に示した。ほとんどの場合 PYG 培地を使用した。PYG 培地で発育の悪いものについては TYG 培地を用い, 上記 2 種の培地でも良好な発育を得られなかったものについては玉井・福田培地<sup>14)</sup> (以下 T-F 培地と記す) を用いた。*C. botulinum* C 型並びに *C. chauvoei* の様なはえにくい菌については上記の培地では心ずしも発育が良くないため,

特に「prereduced」TYG 培地を用いた。「prereduced」TYG 培地作製法は東らの Hungate の変法<sup>15)</sup> に準じた。

## III. マイトマイシン C (MC) に対する感受性の検討

肝片加肝ブイヨン 16 時間培養液 1 ml を 20 ml の新鮮培地, 主として PYG を用い, 発育の悪いものについては TYG 培地に植菌し, 37°C で培養を行なった。菌の増殖は島津スペクトロニック 20 光電比色計を用い, 波長 560 nm で Optical Density (OD<sub>560</sub>) を測定し, 対数増殖期初期 (OD<sub>560</sub> ≒ 0.15) に MC を最終濃度 2 μg/ml になる様に加え (*C. sordellii* の場合前報<sup>2)</sup> との

表 2 使用培地とその組成

PYG medium:		
Proteose peptone No. 2 (Difco)		2.0 % (W/V)
Yeast extract (Difco)		0.5 %
Glucose		1.0 % (W/V)
NaCl		0.5 %
Na-thioglycollate		0.1 %
pH 7.2 120 °C— 15' 滅菌		
TYG medium:		
Trypticase (BBL)		3.0 % (W/V)
Yeast extract (Difco)		1.0 % (W/V)
Glucose		0.5 %
NaCl		0.5 %
Na-thioglycollate		0.1 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.2 %
pH 7.2 120 °C— 15' 滅菌		
T-F medium:		
Modified TGC (Nissan)		3.0 % (W/V)
Brain Heart Infusion (Nissan)		2.5 % (W/V)
Yeast extract (Difco)		0.3 %
Glucose		0.5 %
pH 7.0 115 °C— 15' 滅菌		

比較のため特に  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  を使用し、さらに近接グループである *C. bifermentans* についても *C. sordellii* との比較のため  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度を用いた。さらに  $37^\circ\text{C}$  で培養を続けた。MC 添加後、3 時間以内に生じた菌の溶解を次に述べるような 3 段階に分けて判定した。

1) 感受性(+)：即ち MC 添加後、しばらくは OD 値が増加を続けた後、OD 値の減少が起これ、その減少値が 0.2 以上の場合、MC 感受性(+)と判定した。

2) 感受性(+)：OD 560 値の減少が 0.19 ~ 0 の場合、感受性(+)で示した。「0」とは MC 添加後、幾分 OD 560 値が増加した後、増殖が停止したまま菌溶解も起こらないものを示す (OD 560 値は増加も減少も認めない)。

3) 感受性(-)：MC 添加後、OD 値の減少を全く認めることの出来ないもので、この中には MC 非添加の場合とほとんど同様の OD 560 値の増加を示す完全に「感受性(-)のグループ」から、MC 添加後、増殖は抑えられつつも、OD 値の増加を示す場合も感受性(-)として含まれる。

#### IV. 紫外線(UV)に対する感受性の検討

この試験は *C. tetani* に対してのみ行なった。肝片加肝ブイオン 16 時間培養液  $1 \text{ ml}$  を  $20 \text{ ml}$  の TYG 培地に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で培養を行ない、菌の発育を OD 560 で測定し、対数増殖期中期 (OD 560 = 0.5) に遠心集菌し (3,000 r.p.m. 20 分)、0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)  $6 \text{ ml}$  に懸濁した。これを滅菌シャーレに移し、紫

外線 (東芝殺菌灯, 100V, 14W) を  $1 \text{ m}$  の距離で 1, 2, 3 分照射した後、その  $2 \text{ ml}$  を  $20 \text{ ml}$  の新鮮な TYG に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で培養を行ない経時的に OD 560 を測定した。なお、判定は紫外線 3 分照射後、培養 6 時間以内に起こった菌の溶解を OD 560 値の減少の割合により調べた。感受性の表示は前記の MC に対する感受性表示と同一の規準によった。なお、1, 2 分照射による感受性は参考とするに留めた。

#### V. phage-like particles の検索

PYG 培地を用いて MC 添加により溶菌を起こさせ、この MC 溶菌液  $40 \sim 60 \text{ ml}$  を  $3,000 \times \text{g}$ , 15 分間遠心し、上清液をさらに  $100,000 \times \text{g}$ , 90 分間超遠心後、ペレットを作製した。それを 2% 燐タングステン酸 (pH 6.0 ~ 7.0) によるネガティブ染色を行ない、電子顕微鏡 JEM 7-5480 (日本電子 KK 東京) で観察した。但し、*C. tetani* は TYG 培地を用い紫外線による溶菌液について検索した。

## 結 果

### I. 病原 Clostridia の MC 感受性

被験各菌種については、用いた菌株中最も多く見られる感受性を代表として、図 1 に示した。病原 Clostridia 7 菌種 193 株の MC に対する感受性を検討した結果を表 3 に示した。*C. chauvoei* 使用 22 株全て感受性(+)であった (図 1 a)。そのうち 5 株は 0.1 以上の

表3 病原性 Clostridia のマイトマイシンCに対する感受性

Species	Number of strains	Medium	Number of strains showing		
			OD decrease $0.2 \geq$	OD increase $0.19-0^*$	OD increase $0 <$
<i>C. chauvoei</i>	22	TF	0	22	0
<i>C. septicum</i>	17	TYG	0	0	17
<i>C. botulinum</i> type C					
toxigenic	14	TYG	0	14	0
nontoxigenic	8	TYG	0	8	0
<i>C. sordellii</i> urease					
-positive	10	PYG	4	6	0
-negative	8	PYG	2	6	0
<i>C. bifermentans</i> classical type	24	PYG	0	6	18
aberrant type	6	PYG	2	4	0
<i>C. histolyticum</i>	6	PYG	3	3	0
<i>C. perfringens</i> type A					
isolated from soil samples					
unheated	25	PYG	4	5	16
heated at 70 C for 10 min	10	PYG	0	6	4
heated at 100 C for 1 hr or more	21	PYG	2	4	15
type C					
toxigenic	5	PYG	2	2	1
nontoxigenic	7	PYG	2	2	3
type D					
toxigenic	9	PYG	0	4	5
nontoxigenic	1	PYG	0	0	1

\* Refer to the Materials and Methods.

OD 560の減少を示したが、それらはいずれも長期間著者の教室に保存していた菌株である。これに反して、0.1以下のOD 560の減少を示した17株中、教室保存株は1株のみで残り16株は新鮮分離株であった。*C. septicum* は全て2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のMCによっては全く影響を受けなかったで、さらに5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のMC濃度を用いて検討したが、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ と同様、全く影響を認めなかった(図1b)。*C. botulinum*C型22株は全株、感受性(+)であったが、感受性(+)の菌株はなかった(図1c)。感受性(+)と判定した菌株の中では、0.1以上のOD 560の減少を示した7株は、全株、有毒株で

あったのに反し、0.1以下のOD 560の減少を示した残りの中に、8株の無毒株が含まれていた。上述の如く*C. chauvoei*, *C. botulinum*C型はMCに対し感受性(+)の成績を示したが、これらの菌種の中には被験培地中での発育が必ずしも良いとはいえないものが多かった。このことはこれらの菌群が嫌気条件に関して、特に厳密な制約を受けることによるのではないかと考え、さらに「prereduced」TYG培地を用いて検討した。この培地の利点としては、培地作製時から完全に還元されており、且つまたODの測定時、培養液を振盪する際も気相が炭酸ガスで置換されており、さら

にゴムキャップで密閉されていることにより、全く空気と触れないという点である (MCの効果は増殖の盛んな細胞により良く働くので、良好な発育でのMCの影響をみる必要がある)。しかし、「prereduced」TYG培地中では確かに良好な増殖を得ることが出来たが、

MCに対しては僅かに感受性(+)な程度で、これらの菌種は発育の良、不良にかかわらずMCに対して感受性(+)のものは認められなかった。*C. sordellii* の今回用いた18株はすべて無毒株であるが、ウレアーゼに関しては陽性10株、陰性8株であった。そのうち6株

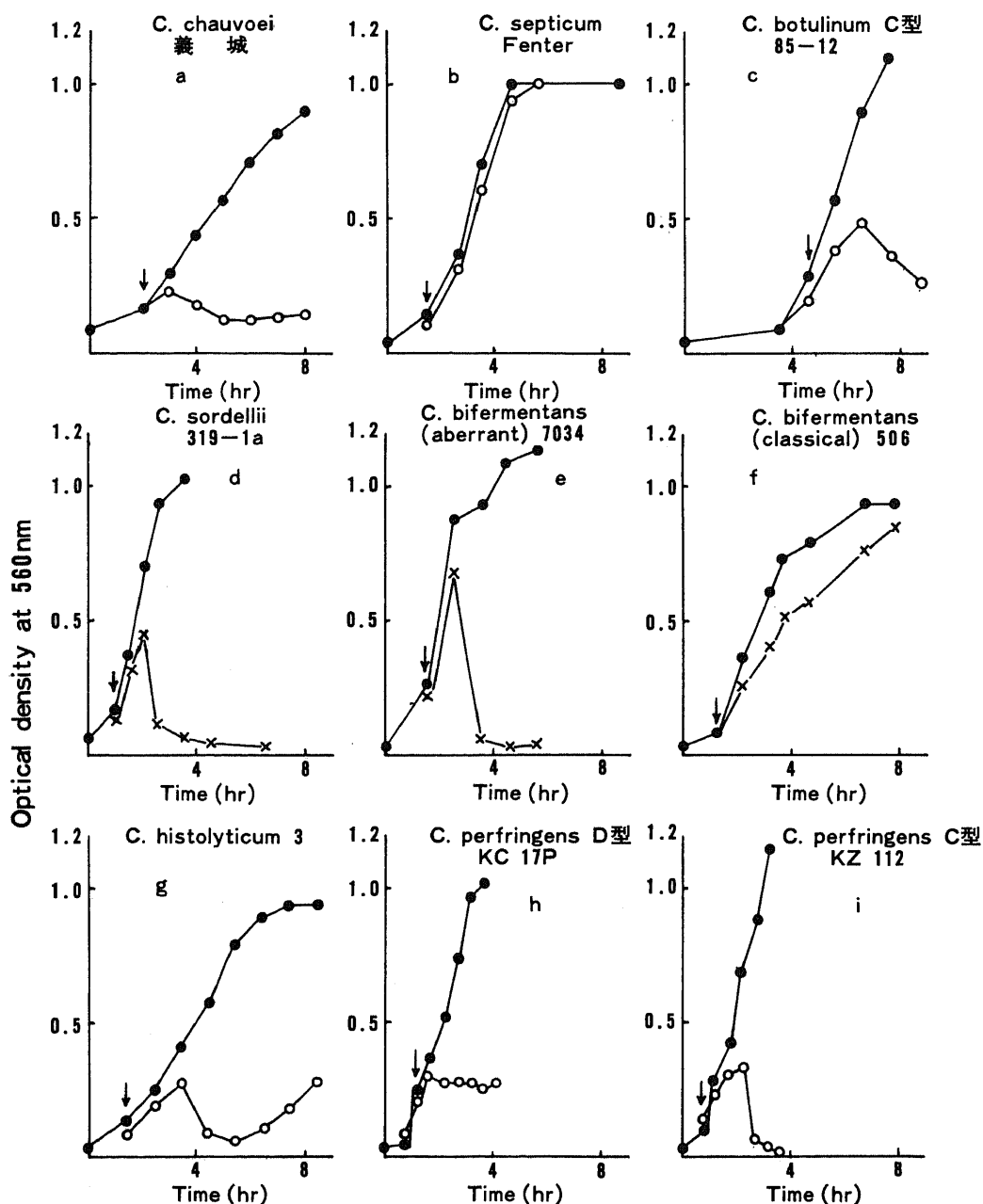
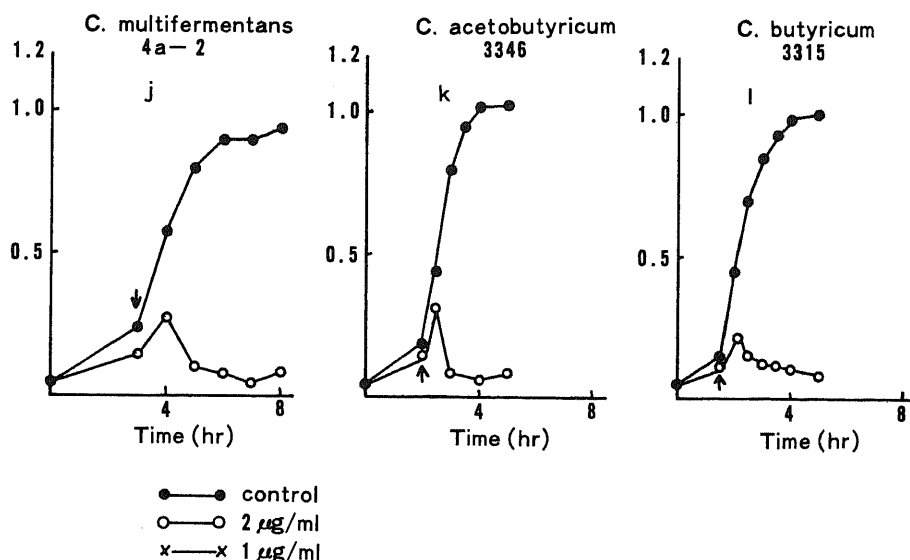


図1 *Clostridia* のマイトマイシンCに対する感受性



が感受性(+), 12株が感受性(+)と判定された (図 1 d)。但し, MC感受性とウレアーゼ産生との間の関係は認められなかった。*C. bifermentans* の異型として区別した 6 株 (方法の項参照) 中 2 株は MC に対し感受性(+) (図 1 e) であり, 残り 4 株も感受性(+) の程度ではあるが, OD 減少 0.1 以上で著明な溶菌が認められた。これに反し, 正常型 (方法の項参照) の 24 株中, 6 株にのみ溶菌がみられ, 且つ OD 減少は 0.1 以下にすぎなかった。正常型では圧倒的に感受性(-)が多かった (図 1 f)。*C. histolyticum* については 6 株中 3 株は感受性(+)と判定され (図 1 g), 3 株は感受性(+)と判定されたが, 無毒の 948 株の MC による溶菌は他のものより明確に弱いものであった。*C. perfringens* の土壌由来野性株 56 株 (内, 非加熱分離菌, 70℃ 10 分加熱分離菌合計 35 株, 100℃ 1 時間あるいは, それ以上加熱分離菌合計 21 株) を用いて加熱条件と MC 感受性との関係を検討したが, 何ら関係がみられなかった。このうち感受性(+) 6 株, (+) 15 株, (-) 35 株であった。C 型に関しては使用菌株 12 株中 4 株が感受性(+)と判定され, また 4 株が(+)と判定された。この 12 株中,  $\beta$ -毒素原性と MC 感受性との間に何ら特別な関係を認めることは出来なかった (C 型 12 株中, 7 株はすでに  $\beta$ -毒素産生を示さなかった) (図 1 i)。D 型使用菌株 10 株の  $\epsilon$ -毒素原性を検索した所, 9 株に  $\epsilon$ -毒素原性を認めたが, MC に対する溶原性は 4 株が感受性(+), 6 株が感受性(-)と判定され,  $\epsilon$ -毒素原性と溶原性との間には関係はみられなかった (図 1 h)。

但し, C 型菌にはかなり高率に MC 感受性株がみられた。

## II. *C. tetani* の紫外線 (UV) に対する感受性の検討

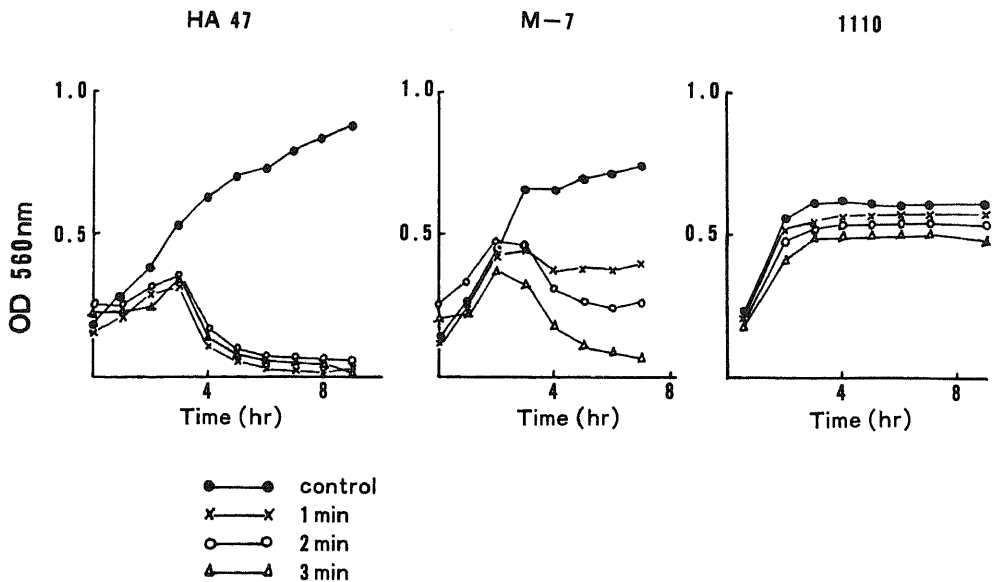
*C. tetani* は 2 µg/ml の MC 濃度では溶菌を起こさず, 溶菌を起こすには 5 µg/ml の高濃度の MC を必要とし, むしろ UV に対する感受性の方が明確にみられたので, UV に対する感受性を検討した。UV に対する感受性, 非感受性の代表的発育曲線を図 2 に示した。被験有毒 26 株中,  $10^4$  MLD/ml の 8 株中 5 株,  $10^3$  MLD/ml の 8 株中 7 株,  $10^2$  MLD/ml の 8 株中 5 株が感受性を示し,  $10^4$  MLD/ml を有した KZ1142,  $10^2$  MLD/ml を有した KZ1143, KZ1151 株は非感受性であり, 形態, 培養性状, 生化学的性状, DNA-DNA homology (Nakamura unpublished) により, *C. tetani* 無毒株とされた 4 株中 3 株 (M-2, M-6, M-14) に UV 感受性を認め, 溶原性と毒素原性との間には関係を見ることは出来なかった。

## III. 非病原性 Clostridia の MC 感受性の検討

他の非病原性 Clostridia の MC 感受性は各菌種に属する菌株数も少ないので, これらの菌種の MC 感受性については一応の参考成績として表 4 に示した。しかしながら, *C. multifерmentans* は用いた 4 株共 MC に対し, 感受性(+)であった (図 1 j)。また, *C. acetobutyricum*, *C. butyricum* の MC 感受性株を図 1 k, l に示した。

## IV. phage および phage-like particles の検討

*C. tetani*, *C. bifermentans*, *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. multifерmentans* について UV や

図2 *C. tetani* の紫外線に対する感受性表4 非病原性 *Clostridia* のマイトマイシンCに対する感受性

Species	No. of strains tested	Number of showing OD decrease of O*
<i>C. butyricum</i>	4	3
<i>C. multifementans</i>	4	4
<i>C. acetobutyricum</i>	3	2
<i>C. cochlearium</i>	6	2
<i>C. tetanomorphum</i>	4	3
<i>C. absonum</i>	5	2
<i>C. paraperfringens</i>	7	0
<i>C. tertium</i>	5	0
<i>C. difficile</i>	2	0
<i>C. capitovale</i>	2	0
<i>C. sphenoides</i>	2	0
<i>C. carnis</i>	1	0
<i>C. innocuum</i>	1	0
<i>C. paraputrificum</i>	1	0
<i>C. lentoputrescens</i>	1	1

# PYG medium was used for all strains tested.

\* Refer to the text.

MCに極めて高い感受性を示した株の溶菌液中の phage-like particles の検索を試みた。phage-like particles は *C. perfringens* S003-3, *C. bifermentans* 7031, 7036, *C. tetani* 6116, *C. histolyticum* 3 各菌株の  $100,000 \times g$ , 90分超遠心後のUVやMC溶菌液のペレット中に見い出すことが出来たが<sup>3</sup>(図略),

*C. tetani* HA47株は図2に示す様にUV照射により急激に溶菌するにもかかわらず、そのペレット中からphage-like particles を検出できなかった。また、ゆるやかな溶菌を示した *C. chauvoei* MC溶菌液から何ら phage-like particles は検出できなかった。又、ブランク形成を試みたが形成できなかった。



## 考 案

*C. botulinum* C型の溶原性と毒素原性の間に密接な関係があることは、既に Inoue ら<sup>4)</sup>, Eklund ら<sup>6)</sup>によって述べられているが、私は本論文で、自然界から分離した直後の野生株を用いて検討した所、ややこの様な関係を暗示する様な結果を得た。自然環境から分離される *C. perfringens* の溶原性については既に、Smith<sup>16)</sup>, 内山<sup>17)</sup>, 今村ら<sup>18)</sup>の研究があるが、これらの中では毒素原性との関係について検討されていない。著者の研究も直接、溶原性と毒素原性との関係について検討したものではないが、加熱条件を異ならせた場合、即ち、100℃ 1hr, あるいはそれ以上加熱した場合と、非加熱あるいは70℃ 10分加熱した場合では、歴然とした $\alpha$ -毒素原性の差が得られるという Yamagishi ら<sup>10)</sup>の報告があるので、加熱条件を異にする2群を用いて検討したが、加熱条件と何ら密接な関係がみられなかったことから考えて、両者の間に相関はないと考える。河合ら<sup>19)</sup>は既に、*C. perfringens* の溶原性と $\epsilon$ -毒素原性との間には、密接な関係はみられないと述べている。*C. perfringens* の $\beta$ -あるいは $\epsilon$ -毒素原性と溶原性との問題を検討したが、有意な関係はないように思われる。*C. tetani* の溶原性に関しては既に、Presscott ら<sup>20)</sup>が試みた7株の全てにMC-induced lysis が認められなと述べているが、私は本論文でUV感受性によって検討し、そのinduced lysis を全くみない株も毒素原性が高いこと、また形態、培養性状、生化学的性状、DNA-DNA homology により、*C. tetani* 無毒株 (Nakamura unpublished) とされたもののうち induced lysis を起こす株を見ることによって、この両者に関係はないものと推定した。Shimamura ら<sup>21)</sup>は *C. sordellii* を用いて、毒性株がよりMC-感受性であると述べたが、無毒株の全てでもまた、MC-感受性であると述べ、直接、溶原性との関係を否定している。元来、以上の研究でMC-感受性が毒素原性に関係するかどうかについて調べる時の1つの難関は、病原性 clostridia では、無毒株が同定しにくいことである。私は、この論文の中で、加熱条件を変えたり、特異的に凝集する抗血清を用いたり、DNA-DNA homology により、又、長期間保存するという種々の方法によって無毒株を選び、これと比較検討した。今回の研究でも全て *C. sordellii* は無毒株であることをかんがみて用いたが、これらは全て、MC-感受性であり、直接毒素原性と溶原性との間に、関係はないものと思われる。著者の研究はまた、分類学上、非常に似たグループである *C. ch-*

*auvoui* と *C. septicum*, あるいは *C. sordellii* と *C. bifermentans* の間に、特に前二者にMC-感受性の上で甚しい差のあることを示した。これと同じ現象として、既に Kiritani ら<sup>1)</sup>が *C. sporogenes* と *C. botulinum* で、竹松<sup>3)</sup>が *C. novyi* B型と *C. haemolyticum* の間で、その分類学上、極めて近いにもかかわらず、MC-感受性の上で著しい差のあることを示している。これらのうちでも *C. chauvoui* と *C. septicum* が特に、MC-感受性について顕著な差異を示すように思われる。これらの相似した2つの菌種は、現在、主としてその可溶性抗原によって分けられているが、この可溶性抗原と溶原性との関係は、将来さらに検討されるべきものと考ええる。また、phage-like particles の検索は多くの場合、MCやUV溶菌液を 100,000  $\times$  g, 90分超遠心後のペレットで試みたが、MCやUVに著明な溶菌現象を示したにもかかわらず、ペレット中には極めて僅かの phage-like particles が認められるに過ぎなかった。時として激しい溶菌を起こしたが、見出すことのできない場合もあった (*C. tetani* HA 47の場合)。この事実から、MCあるいはUV照射後の急激な菌の融解は、菌細胞内での phage-like particles の増大、あるいは孢子形成菌のもつ自己解体系が関与しているように思われる。1) 2) 3) 21) ~ 25)

## 結 論

種々の clostridia の溶原性について検討した所、*C. chauvoui*, *C. botulinum* C型, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. multifermentans* の全ての株、*C. bifermentans*の異型株の全てがMCに感受性であった。また、*C. tetani* と *C. perfringens* は試みた株の半数以上が、UVやMCにそれぞれ感受性を示した。*C. botulinum* C型のMC感受性と毒素原性との間にいくらかの関係を見出すことができたが、*C. tetani*, *C. perfringens* においては、UVやMC感受性と毒素原性について関係を見出すことは出来なかった。*C. septicum* は被験株全てがMC非感受性であった。又、*C. bifermentans* (正常型)の大多数もMC非感受性であった。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を戴いた西田尚紀教授に心から御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり御協力御教示を賜った金沢大学歯科口腔外科玉井健三助教授、微生物学教室中村信一助教授はじめ教室員各位並びに歯科口腔外科医局員各位に深謝致します。また菌株の分与を受けた、農林省家畜衛生試験場東重三博士、東京都立衛研坂井千三博士、電子顕微鏡操作に御協力を得た金沢大学がん研究所伊藤正人氏に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Kiritani, K., Mitsui, N., Nakamura, S. & Nishida, S.: Jap. J. Microbiol., 17, 361 (1973).
- 2) Shimamura, T., Nakamura, S., Hayase, M. & Nishida, S.: J. Med. Microbiol., 7, 277 (1974).
- 3) 竹松啓一: 十全医会誌, 83, 775 (1974).
- 4) Inoue, K. & Iida, H.: Jap. J. Microbiol., 14, 87 (1970).
- 5) Oguma, K., Iida, H. & Inoue, K.: Jap. J. Microbiol., 19, 167 (1975).
- 6) Eklund, M. W., Poysky, F. T., Reed, S. M. & Smith, C. A.: Science., 172, 480 (1971).
- 7) Nakamura, S., Shimamura, T. & Nishida, S.: Can. J. Microbiol., 22, 673 (1976).
- 8) 芹川俊彦・山田邦代・木村晋亮・中村信一・西田尚紀: 日本食品衛生学会第30回學術講演会講演要旨, 62 (1975).
- 9) Nakamura, S., Shimamura, T., Hayashi, H. & Nishida, S.: J. Med. Microbiol., 8, 299 (1975).
- 10) Yamagishi, T., Ishida, S. & Nishida, S.: J. Bacteriol., 88, 646 (1964).
- 11) Oakley, C. L. & Warrack, G. H.: J. Hyg., 51, 102 (1953).
- 12) 吉沢潤・西田尚紀: 医学と生物学, 71, 5 (1965).
- 13) 真田一郎: 十全医会誌, 70, 612 (1964).
- 14) 玉井健三・福田順子: 日本口腔科学会雑誌, 19, 495 (1970).
- 15) 東量三: 水産物化学. 食品学実験書 (斎藤・内山・梅本・河端編), 440, 東京, 恒星社厚生閣 (1974).
- 16) Smith, H. W.: J. Gen. Microbiol., 21, 622 (1959).
- 17) 内山一雄: 鹿児島大学医学雑誌, 18, 131 (1966).
- 18) 今村禎祐: 鹿児島大学医学雑誌, 18, 952 (1966).
- 19) 河合康守・山岸高由・石田勝一: 医学と生物学, 64, 170 (1962).
- 20) Prescott, L. M. & Altenbern, R. A.: J. Bacteriol., 93, 1220 (1967).
- 21) Altenbern, R. A. & Stull, H. B.: J. Gen. Microbiol., 39, 53 (1965).
- 22) Galli, E. & Hughes, D. E.: J. Gen. Microbiol., 39, 345 (1965).
- 23) Kawata, T. & Takumi, K.: Jap. J. Microbiol., 15, 1 (1971).
- 24) Ogata, S. & Hongo, M.: J. Gen. Microbiol., 81, 315 (1974).
- 25) 西田尚紀: 食品衛生学雑誌, 17, 1 (1976).

## Abstract

In screening the lysogeny of several clostridia, susceptibility to mitomycin C (MC) or ultra-violet (UV) ray was found among all strains of *Clostridium chauvoei*, *C. botulinum* type C, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. multifementans* and aberrant type *C. bifermentans* strains and among the greater part of strains of *C. tetani* and *C. perfringens*.

The MC-sensitivity was hardly demonstrable among *C. septicum* strains and among a majority of *C. bifermentans* (normal type) strains. In spite of the frequent occurrence of MC- or UV- susceptible strains in these clostridia, confirmatory finding between toxigenicity and MC- or UV- sensitivity of these clostridia could not be observed except among the strains of *C. botulinum* type C.